

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 11-127863

(43)Date of publication of application : 18.05.1999

(51)Int.Cl.

C12N 15/09  
C12N 1/15  
//(C12N 15/09  
C12R 1:645 )  
(C12N 1/15  
C12R 1:645 )

(21)Application number : 09-301078

(71)Applicant : MORI SANGYO KK

(22)Date of filing : 31.10.1997

(72)Inventor : SAITO TAKESHI

**(54) NEW VECTOR**

**(57)Abstract:**

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To obtain a vector containing a DNA having a promoter activity and originated from *Lyophyllum shimeji* and a DNA having a terminator activity and capable of transforming both kinds of basidiomycetes comprising mycorrhizal fungi and wood-destroying fungi.

**SOLUTION:** This vector contains a DNA having a base sequence of formula I (or the base sequence in which one or more bases are deleted, replaced or added) and having a promoter activity and a DNA having a base sequence of formula II (or the base sequence in which one or more bases are deleted, replaced or added) and having a terminator activity. The promoter region and the terminator region can be specified by a method such as a method comprising isolating and identifying the glyceraldehyde-3-phosphoric acid dehydrogenase gene (GPD gene) by a known method and subsequently specifying an initiation codon and a termination codon from the base sequence of the GPD gene.

|  |     |
|--|-----|
| PARANALYTIC TESTS OF THE GROSSER, K. A. DEPARTMENT OF CHEMISTRY, STATE COLLEGE | 60  |
| PARANALYTIC TESTS OF THE GROSSER, K. A. DEPARTMENT OF CHEMISTRY, STATE COLLEGE | 720 |
| PARANALYTIC TESTS OF THE GROSSER, K. A. DEPARTMENT OF CHEMISTRY, STATE COLLEGE | 780 |
| PARANALYTIC TESTS OF THE GROSSER, K. A. DEPARTMENT OF CHEMISTRY, STATE COLLEGE | 100 |

|               |            |              |            |     |
|---------------|------------|--------------|------------|-----|
| TRANSMISSIONS | ALTERNATE  | TRANSMISSION | CONNECTION | 62  |
| CONNECTION    | CONNECTION | CONNECTION   | CONNECTION | 63  |
| CONNECTION    | CONNECTION | CONNECTION   | CONNECTION | 64  |
| CONNECTION    | CONNECTION | CONNECTION   | CONNECTION | 65  |
| CONNECTION    | CONNECTION | CONNECTION   | CONNECTION | 66  |
| CONNECTION    | CONNECTION | CONNECTION   | CONNECTION | 67  |
| CONNECTION    | CONNECTION | CONNECTION   | CONNECTION | 68  |
| CONNECTION    | CONNECTION | CONNECTION   | CONNECTION | 69  |
| CONNECTION    | CONNECTION | CONNECTION   | CONNECTION | 70  |
| CONNECTION    | CONNECTION | CONNECTION   | CONNECTION | 71  |
| CONNECTION    | CONNECTION | CONNECTION   | CONNECTION | 72  |
| CONNECTION    | CONNECTION | CONNECTION   | CONNECTION | 73  |
| CONNECTION    | CONNECTION | CONNECTION   | CONNECTION | 74  |
| CONNECTION    | CONNECTION | CONNECTION   | CONNECTION | 75  |
| CONNECTION    | CONNECTION | CONNECTION   | CONNECTION | 76  |
| CONNECTION    | CONNECTION | CONNECTION   | CONNECTION | 77  |
| CONNECTION    | CONNECTION | CONNECTION   | CONNECTION | 78  |
| CONNECTION    | CONNECTION | CONNECTION   | CONNECTION | 79  |
| CONNECTION    | CONNECTION | CONNECTION   | CONNECTION | 80  |
| CONNECTION    | CONNECTION | CONNECTION   | CONNECTION | 81  |
| CONNECTION    | CONNECTION | CONNECTION   | CONNECTION | 82  |
| CONNECTION    | CONNECTION | CONNECTION   | CONNECTION | 83  |
| CONNECTION    | CONNECTION | CONNECTION   | CONNECTION | 84  |
| CONNECTION    | CONNECTION | CONNECTION   | CONNECTION | 85  |
| CONNECTION    | CONNECTION | CONNECTION   | CONNECTION | 86  |
| CONNECTION    | CONNECTION | CONNECTION   | CONNECTION | 87  |
| CONNECTION    | CONNECTION | CONNECTION   | CONNECTION | 88  |
| CONNECTION    | CONNECTION | CONNECTION   | CONNECTION | 89  |
| CONNECTION    | CONNECTION | CONNECTION   | CONNECTION | 90  |
| CONNECTION    | CONNECTION | CONNECTION   | CONNECTION | 91  |
| CONNECTION    | CONNECTION | CONNECTION   | CONNECTION | 92  |
| CONNECTION    | CONNECTION | CONNECTION   | CONNECTION | 93  |
| CONNECTION    | CONNECTION | CONNECTION   | CONNECTION | 94  |
| CONNECTION    | CONNECTION | CONNECTION   | CONNECTION | 95  |
| CONNECTION    | CONNECTION | CONNECTION   | CONNECTION | 96  |
| CONNECTION    | CONNECTION | CONNECTION   | CONNECTION | 97  |
| CONNECTION    | CONNECTION | CONNECTION   | CONNECTION | 98  |
| CONNECTION    | CONNECTION | CONNECTION   | CONNECTION | 99  |
| CONNECTION    | CONNECTION | CONNECTION   | CONNECTION | 100 |

## LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 31.10.1997

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number] 2986437

[Date of registration] 01.10.1999

[Number of appeal against examiner's decision

of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's  
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

01.10.2002

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平11-127863

(43) 公開日 平成11年(1999) 5月18日

|                           |       |               |
|---------------------------|-------|---------------|
| (51) Int.Cl. <sup>6</sup> | 識別記号  | F I           |
| C 1 2 N 15/09             | Z N A | C 1 2 N 15/00 |
| 1/15                      |       | 1/15          |
| // (C 1 2 N 15/09         | Z N A |               |
| C 1 2 R 1: 645)           |       |               |
| (C 1 2 N 1/15             |       |               |

審査請求 有 請求項の数 4 O L (全 9 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平9-301078

(22) 出願日 平成9年(1997)10月31日

(71) 出願人 390039963

森産業株式会社

群馬県桐生市西久方町1丁目2番23号

(72) 発明者 斉藤 武

群馬県桐生市西久方町1-2-23 森産業株式会社内

(74) 代理人 弁理士 平木 祐輔 (外1名)

(54) 【発明の名称】 新規ベクター

(57) 【要約】

【解決手段】 プロモーター活性を有するDNA及びターミネーター活性を有するDNA、上記DNAを含むベクター、並びに上記ベクターによって形質転換された形質転換体である。

【効果】 木材腐朽菌及び菌根菌のいずれの担子菌をも形質転換することができる。

## 【特許請求の範囲】

【請求項 1】 以下の (a) または (b) の塩基配列により表され、かつプロモーター活性を有する DNA。

(a) 配列番号 1 に記載の塩基配列。

(b) 配列番号 1 に記載の塩基配列において、1 若しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列。

【請求項 2】 以下の (a) または (b) の塩基配列により表され、かつターミネーター活性を有する DNA。

(a) 配列番号 2 に記載の塩基配列。

(b) 配列番号 2 に記載の塩基配列において、1 若しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列。

【請求項 3】 請求項 1 に記載の DNA 及び／又は請求項 2 に記載の DNA を含むベクター。

【請求項 4】 請求項 3 に記載のベクターによって形質転換された形質転換体。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、プロモーター活性を有する DNA、ターミネーター活性を有する DNA、並びにそれらを利用したベクター及び形質転換体に関する。

## 【0002】

【従来の技術】ホンシメジ (*Lyophyllum shimeji*) は担子菌に属し、従来、菌根菌として扱われてきた。しかし、最近、腐生菌や木材腐朽菌と同様に穀物や木粉などをを用いた人工の培地で生育し、子実体を形成することのできる品種が発見された (Ohta, A. *Mycoscience* 35, 147-151 (1994) 参照)。また、ハタケシメジ (*Lyophyllum decastes*) は地中に埋もれた木材などに生育する木材腐朽菌であるが、このハタケシメジは形態的にはホンシメジに非常に近く、ホンシメジと同種ではないかとも考えられている。以上のことを考慮すれば、ホンシメジは木材腐朽菌と菌根菌の両方の性質を有している可能性が大きい。

【0003】一方、これまで担子菌を形質転換した例は世界的にも少なく、担子菌を形質転換するために開発された担子菌用ベクターも非常に少なかった。しかも、これらの担子菌用ベクターに用いられたプロモーター及びターミネーターは木材腐朽菌由来のものであったので、このベクターを用いて菌根菌を形質転換することはできなかった。このため、菌根菌を形質転換することができるベクターの開発が望まれている。

## 【0004】

【発明の解決しようとする課題】本発明は、木材腐朽菌及び菌根菌のいずれをも形質転換することができるベクターを提供することを目的とする。

## 【0005】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記課題

を解決するために鋭意研究した結果、ホンシメジのグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子

(以下、「GPD 遺伝子」という) の全領域の塩基配列を決定するとともに、GPD 遺伝子のプロモーター領域及びターミネーター領域を特定することにより、ホンシメジ由来のプロモーター活性を有する DNA 及びターミネーター活性を有する DNA を含むベクターを用いれば、菌根菌及び木材腐朽菌のいずれの担子菌をも形質転換できることを発見し、本発明を完成するに至った。

【0006】すなわち、本発明は、以下の (a) または (b) の塩基配列により表され、かつプロモーター活性を有する DNA である。

(a) 配列番号 1 に記載の塩基配列。

(b) 配列番号 1 に記載の塩基配列において、1 若しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列。

【0007】また、本発明は、以下の (a) または

(b) の塩基配列により表され、かつターミネーター活性を有する DNA である。

(a) 配列番号 2 に記載の塩基配列。

(b) 配列番号 2 に記載の塩基配列において、1 若しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列。

さらに、本発明は、上記 DNA を含むベクターである。

さらに、本発明は、上記ベクターによって形質転換された形質転換体である。

## 【0008】

【発明の実施の形態】以下、本発明を詳細に説明する。本発明の DNA は、以下の (a) または (b) の塩基配列により表される。

(a) 配列番号 1 に記載の塩基配列。

(b) 配列番号 1 に記載の塩基配列において 1 若しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列。

ここで、「1 若しくは複数個の塩基」とは、本願の出願時に常用される技術により欠失、置換若しくは付加することができ、かつプロモーター活性を喪失させない限り、その個数は特に限定されないが、通常は、部位特異的変異誘発法 (Zoller ら, *Nucleic Acids Res.* 10, 6487-6500, 1982) により欠失、置換若しくは付加することができる個数、即ち、1 若しくは数個を意味する。

【0009】また、本発明の DNA は、以下の (a) または (b) の塩基配列により表される。

(a) 配列番号 2 に記載の塩基配列。

(b) 配列番号 2 に記載の塩基配列において、1 若しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列。

ここで、「1 若しくは複数個の塩基」とは、上記と同様の意味である。本発明の DNA は、例えば、以下の工程により得ることができる。

## (1) GPD遺伝子の単離・同定

## (2) プロモーター領域及びターミネーター領域の特定

## (3) プロモーター活性を有するDNA及びターミネーター活性を有するDNAの単離

【0010】以下、各工程を説明する。

## (1) GPD遺伝子の単離・同定

GPD遺伝子の単離・同定は、公知の方法に従って行なうことができる。GPD遺伝子の単離は、例えば、次の方法によって行なうことができる。すなわち、ホンシメジから抽出したホンシメジの全DNAを鋳型とし、既知のGPD遺伝子間でよく保存されている部分の塩基配列に従って作製したプライマーを用いてPCR法を行ない、目的のGPD遺伝子の一部を単離する。そして、これをプローブとし、ホンシメジの全DNAに対してザンハイブリダイゼーションを行なうことにより、目的のGPD遺伝子を単離することができる。また、GPD遺伝子の同定は、例えば、マクサム・ギルバート法、サンガー法、又はこれらの自動化された変法等を用いて行なうことができる。

## 【0011】(2) プロモーター領域及びターミネーター領域の特定

プロモーター領域及びターミネーター領域の特定は、公知の方法に従って行なうことができる。例えば、DNA-mRNAのヘテロデュプレックスを電子顕微鏡で観察する方法、S1マッピングを行なう方法、cDNAライブラリーから得られた遺伝子の塩基配列と染色体DNAライブラリーから得られた遺伝子の塩基配列とを比較する方法等を用いて、プロモーター領域及びターミネーター領域を特定することができる。また、GPD遺伝子の塩基配列から開始コドン及び終始コドン进行を特定することにより、プロモーター領域及びターミネーター領域を特定することもできる。

## 【0012】(3) プロモーター活性を有するDNA及びターミネーター活性を有するDNAの単離

プロモーター活性を有するDNA及びターミネーター活性を有するDNAの単離は、適当な制限酵素を用いることによって行なうことができる。例えば、GPD遺伝子を制限酵素NcoIで切断することによりプロモーター活性を有するDNAを単離することができる。また、GPD遺伝子を制限酵素XhoIで切断することによりターミネーター活性を有するDNAを単離することができる。

【0013】また、本発明のDNAは、化学合成により得ることもできる。さらに、本発明のDNAは、その両端に相補的なプライマーを用いたPCR法により得ることもできる。本発明のベクターは、上記プロモーター活性を有するDNA及び／又はターミネーター活性を有するDNAを含む。これらのDNAの間に、目的の遺伝子を配置しておく。ここで、目的の遺伝子とは、それにコードされている遺伝子産物（例えば、タンパク質、rRNA、アンチセンスRNA等）の発現を目的とする遺伝

子を意味する。

【0014】本発明のベクターにより形質転換した形質転換体の検出を容易にするために、上記DNAの間にマーカージン及び／又はレポーター遺伝子を挿入してもよい。このようなマーカージン及びレポーター遺伝子としては、特に限定されず公知のいかなるマーカージン及びレポーター遺伝子をも用いることができる。例えば、マーカージンとしては、ハイグロマイシンBホストトランスフェラーゼ遺伝子、ネオマイシンホストトランスフェラーゼ遺伝子、オロチジン-5-リン酸デカルボキシラーゼ遺伝子等を用いることができ、レポーター遺伝子としては、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子、 $\beta$ -グルクロニダーゼ遺伝子等を用いることができる。

【0015】本発明のベクターの構築は、公知の方法に従って行なうことができる。本発明のベクターの構築に用いることができるベクターは、特に限定されず公知のいかなるベクターであってもよい。例えば、pUC18、pUC19、M13mp18、M13mp19、 $\lambda$ gt10、 $\lambda$ gt11、Ylp32、YRp7、pBI221等を本発明のベクターの構築に用いることができる。本発明の形質転換体は、本発明のベクターを宿主に導入し宿主を形質転換することにより得ることができる。形質転換される宿主は特に限定されないが、担子菌であるのが好ましい。本発明のベクターの宿主への導入は、公知の方法を用いて行なうことができる。例えば、プロトプラスト法、リチウム法、エレクトロポレーション法、又はこれらの変法を用いて本発明のベクターを宿主に導入することができる。

## 【0016】

【実施例】以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明する。但し、本発明はこれらの実施例により何ら限定されるものではない。

## 【実施例1】ホンシメジからのGPD遺伝子の単離

(1) 先ず、ホンシメジ (*Lyophyllum shimeji*) の培養菌糸体から以下の方法で全DNAを抽出、精製した。野生のホンシメジ子実体から菌糸を組織分離しGMY寒天培地（グルコース1%、麦芽エキス1%、酵母エキス0.4%、寒天1.5%）で25℃で培養した。この培養菌糸を寒天培地ごと細かく切り刻み、1.5リットルのGMY液体培地（グルコース1%、麦芽エキス1%、酵母エキス0.4%、pH5.6）に接種して2週間程度振とう培養した。得られた菌糸体（湿重量約100g）を凍結乾燥した。

【0017】凍結乾燥菌糸体2gを乳鉢で破碎し、DNA抽出用緩衝液（100mM トリス-塩酸緩衝液（pH8.0）、100mM NaCl、100mM エチレンジアミン四酢酸（以下EDTAと略称）、1%ドデシル硫酸ナトリウム（以下SDSと略称）、1%メルカプトエタノール）に懸濁して65℃で2時間保温した。25,000×gで10分間遠心し、上清を別の遠心チューブに移した後、等量のTE（10mMトリス-塩酸緩衝液（pH8.0）、1mM EDTA）飽

和フェノールを加えてゆっくり攪拌し、再び25,000×g、10分間遠心して上清を回収するという除蛋白操作を行なった（フェノール処理）。フェノール処理を数回繰り返した後TE飽和フェノール：クロロホルム＝1：1の溶液で同様の処理を行い、上清を回収後1/10量の5M NaClと2.5倍量のエタノールを加えてDNAを析出させた（エタノール沈澱）。細いガラス棒で析出した糸状のDNAを巻き取り、1mlのTEに溶かした後、最終濃度50μg/mlのRNase A (SIGMA CHEMICAL CO.)を加えて37℃、20分保温しRNAを分解した。フェノール処理を2回行ってRNase Aを除去し、エタノール沈澱を行ってガラス棒にてDNAを巻き取り、1mlのTEに溶かしてホンシメジの全DNA試料とした。凍結乾燥菌糸体2gから1mg以上の全DNAが得られた。

|                     |               |     |    |        |
|---------------------|---------------|-----|----|--------|
| ホンシメジ全DNA           | 1μl (200 ng)  | 94℃ | 5分 | 30サイクル |
| プライマー1              | 2μl (20 pmol) | 94℃ | 1分 |        |
| プライマー2              | 2μl (20 pmol) | 50℃ | 1分 |        |
| dNTP                | 2μl (400 μM)  | 68℃ | 3分 |        |
| 10× reaction buffer | 10μl          |     |    |        |
| Tth DNA polymerase  | 1μl           |     |    |        |
| 滅菌水                 | 82μl          |     |    |        |
|                     | 100μl         |     |    |        |

【0020】なお、耐熱性DNAポリメラーゼ（Tth DNA polymerase）と10× reaction bufferは東洋紡績（株）、dNTPはDNA Polymerization Mixをファルマシアバイオテック（株）より購入した。増幅されたDNA断片は大腸菌用ベクターpUC18 (Yanisch-Perron, C. et al. Gene 33, 103 (1985) 参照) の制限酵素SmaI切断部位に連結し、サーカムベントフォトリブDNAシーケンスキット (New England Biolabs, Inc., USA) により塩基配列を決定してGPD遺伝子の一部であることを確認した。さらにこのDNA断片をNEBlotフォトリブキット (New England Biolabs, Inc., USA) によりピオチン標識し、これをプローブとしてホンシメジ全DNAに対してサザンハイブリダイゼーションを行い、図1に示したGPDの構造遺伝子とその転写制御領域（プロモーター領域及びターミネーター領域）を含む約2.75キロベースのDNA断片を検出した。

【0021】（3）図1に示したホンシメジ由来のDNA断片は以下のように2断片に分割して単離した。ホンシメジの全DNAを制限酵素HindIIIで切断しアガロースゲル電気泳動でDNA断片を分画後、この電気泳動パターンに対してサザンハイブリダイゼーションによるGPD遺伝子の検出を行ったところ、ターミネーター領域を含む約1.75キロベースのDNA断片が検出された。このDNA断片を大腸菌用ベクターpUC18のHindIII切断部位に連結してクローニングし、プラスミドpLS-DWを得た（図2参照）。一方、ホンシメジの全DNAを制限酵素HincIIとHindIIIの両方で切断してアガロースゲル電気泳動で分画後、この電気泳動パターンに対してサザンハイブリダイゼーションを行いプロモーター領域を含む約

【0018】（2）ホンシメジのグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子（GPD遺伝子）の検出は以下の手法により行った。すでに報告されている *Schizophyllum commune*、*Agaricus bisporus*、及び *Panerochaete chrysosporium* のGPD遺伝子の塩基配列を参考にして (Martin C. Harmsen ら. Curr. genet. 22, 447-454 (1992) 参照)、担子菌のGPD遺伝子の最もよく保存されていると思われる部分の配列に従って以下に示すようなPCR用プライマーを作製した。  
プライマー1：5'-GGTCTACATGTTCAAGTACGAC-3'  
プライマー2：5'-TAGCCCCACTCGTTGTCGTACC-3'  
このプライマーを用いて以下の反応条件でPCRを行い、約950bpのDNA断片を得た。

【0019】

1キロベースのDNA断片を検出した。このDNA断片を大腸菌用ベクターpUC18のHincII-HindIII切断部位に連結してクローニングし、プラスミドpLS-UPを得た（図3参照）。クローニングされたこの2つのDNA断片に関して、図1に示されている各種制限酵素によって切断箇所を詳細に調べるとともに塩基配列の決定を行い、これらがGPD遺伝子の全領域と配列番号1及び2で示される領域を含む転写制御領域を有することを確認した。

【0022】〔実施例2〕次に、ホンシメジGPD遺伝子の転写制御領域を組み込んだ担子菌の形質転換用ベクター構築の実際を、ハイグロマイシンBホストトランスフェラーゼ遺伝子（hph遺伝子）をマーカー遺伝子として用いた場合について述べる。

（1）まず、プラスミドpLS-UPを制限酵素HincIIで切断し、ホンシメジGPD遺伝子のプロモーター領域を含む約500ベースのDNA断片を得た。これを大腸菌用ベクターpUC18のHincII切断部位に連結し、プラスミドpLS-PR0を作出した（図4参照）。ホンシメジGPD遺伝子は制限酵素NcoIによって開始コドンATGの直前で切断され、プロモーター領域と構造遺伝子以下の領域に分離できることが塩基配列の決定により明らかとなっている。そこでプラスミドpLS-PR0を制限酵素NcoIで切断し、DNA Blunting Kit (宝酒造 (株)) により切り口を平滑末端化した。さらに制限酵素KpnIで切断することにより、下流側にKpnIの切り口を露出させた。一方、hph遺伝子はプラスミドpHph 0 (ベーリンガー・マンハイム (株)) を鋳型としてPCRにより増幅した。増幅の反応条件は以下の通りである。

プライマーA：5'-GGCCCGGGATGACCATGATTACGCCAAGCT-3'

SmaI

プライマー-B : 5'-GGGGTACCCGAAGTGTGGACGAGAACTGTG-3'

KpnI

【0023】

|                             |                         |      |     |        |
|-----------------------------|-------------------------|------|-----|--------|
| pHph 0                      | 1 $\mu$ l (100 ng)      | 94°C | 5 分 | 30サイクル |
| プライマー-A                     | 1 $\mu$ l (10 pmol)     | 94°C | 1 分 |        |
| プライマー-B                     | 1 $\mu$ l (10 pmol)     | 55°C | 1 分 |        |
| dNTP                        | 8 $\mu$ l (200 $\mu$ M) | 72°C | 2 分 |        |
| 10 $\times$ reaction buffer | 10 $\mu$ l              |      |     |        |
| Ex Taq DNA polymerase       | 0.5 $\mu$ l (2.5 U)     |      |     |        |
| 滅菌水                         | 78.5 $\mu$ l            |      |     |        |
| <hr/>                       |                         |      |     |        |
| 100 $\mu$ l                 |                         |      |     |        |

【0024】なお、Ex Taq DNA polymerase は宝酒造（株）から購入し、dNTP、10 $\times$ bufferはEx Taq DNA polymeraseに添付されていたものを用いた。増幅されたhph遺伝子は制限酵素SmaIとKpnIで切断し、先に制限酵素処理をしておいたpLS-PROIに連結して（DNA Ligation Kit Ver.1（宝酒造（株））使用）プラスミドpLS-PHを作出した（図5参照）。これはホンシメジGPD遺伝子のプロモーターの下流にマーカー遺伝子であるhph遺伝子を連結した、ベクターの中間体である。

【0025】（2）プラスミドpLS-PHを制限酵素KpnIで切断し、DNA Blunting Kit（宝酒造（株））を用いて平滑末端化した。一方、プラスミドpLS-DWを制限酵素XhoIとHincIIで切断し、ホンシメジGPD遺伝子のターミナー領域を含む約950 bpのDNA断片を得た。このDNA断片をDNA Blunting Kit（宝酒造（株））を用いて平滑末端化し、先に制限酵素処理及び平滑末端化処理をしておいたプラスミドpLS-PHにDNA Ligation Kit Ver.1（宝酒造（株））を用いて連結しプラスミドpLS-PHTを作出した（図6参照）。ここでプラスミドpLS-PHに連結したDNA断片はターミナー領域だけでなくホンシメジGPDの構造遺伝子の一部も含んでおり、mRNAはhph遺伝子とホンシメジGPD遺伝子との融合遺伝子のコピーとして転写されるが、翻訳の段階でhph遺伝子の終止コドンが認識されホンシメジGPDの部分を含まないハイグロマイシンBホスホトランスフェラーゼが生産される。従ってこれにより、目的のベクターが完成した。

【0026】【実施例3】ホンシメジGPD遺伝子の転写制御領域を組み込んだ担子菌の形質転換用ベクターの担子菌への導入方法の実際を、プラスミドpLS-PHTを木材腐朽菌シイタケ（*Lentinula edodes*）及び菌根菌チチアワタケ（*Suillus granulatus*）に導入し形質転換した場合について述べる。

【0027】（1）シイタケの栄養菌糸をGMY寒天培地（直径9cmのシャーレ4枚）に接種し、20日ほど培養する。この培養菌糸を寒天培地ごとメスで細かく切り刻みシャーレ1枚につき200 mlのGMY液体培地に移植し

て4日間25°Cで静置培養した。培養後300 ml容量の遠心チューブ4本に移し、4,000 $\times$ g、10分間遠心して上清を捨て集菌した。菌糸体を洗浄液（0.6 Mマンニトール、0.05 Mマレイン酸-水酸化ナトリウム緩衝液（pH5.5））200 mlに懸濁し4,000 $\times$ g、10分間遠心して洗浄した。この洗浄操作を3回繰り返し集菌後菌糸体を50 mlの遠心チューブ4本に移して酵素溶液（0.5%セルラーゼオノヅカR-10（生化学工業（株））、0.1%ノボザム234（Novo Nordisk, Denmark）、0.6 Mマンニトール、0.05 Mマレイン酸-水酸化ナトリウム緩衝液（pH5.5））100 mlに懸濁した。30°Cで3時間反応後、G3のガラスフィルターで濾過して残った菌糸を除去し2,000 $\times$ gで遠心してプロトプラストを集めた。このプロトプラストを10 mlのMTC緩衝液（0.6 Mマンニトール、10 mMトリス-塩酸緩衝液（pH8.0）、1 mM EDTA、50 mM塩化カルシウム）に懸濁後、2,000 $\times$ gで遠心してプロトプラストを集め、上清を捨てた。この洗浄操作を3回繰り返し2 $\times$ 10<sup>7</sup>個/400  $\mu$ lになるようプロトプラストをMTC緩衝液に懸濁した。このプロトプラスト溶液400  $\mu$ lに40  $\mu$ gのプラスミドpLS-PHTを加えて氷水中に10分間保温した後ジーンパルサー（Bio-Rad laboratories, Inc., USA）で電気パルスを加え、再び氷水中に10分間保温した。2.5倍量の0.6 M S M Y液体培地（0.6 Mシュクロース、1%麦芽エキス、0.4%イーストエキス）を加えて25°Cで3日間培養して細胞壁を再生させた後、50  $\mu$ g/mlのハイグロマイシンB（和光純薬工業（株））を含む0.6 M S M Y寒天培地（0.6 Mシュクロース、1%麦芽エキス、0.4%イーストエキス、1.5%寒天）にまいて25°Cで2週間培養し出現したコロニーを拾った。再び50  $\mu$ g/mlのハイグロマイシンBを含む0.6 M S M Y寒天培地に植え、生育してきた株を形質転換体の候補株とした（シイタケ野生株に対するハイグロマイシンBの最小生育阻止濃度は10  $\mu$ g/ml）。このプラスミド導入の実験結果を以下の表1に示す。

【0028】

【表1】

| プロトプラスト数        | プラスミド量<br>( $\mu\text{g}$ ) | 印加電圧<br>( $\text{kV}/\text{cm}$ ) | 出現コロニー数 |
|-----------------|-----------------------------|-----------------------------------|---------|
| $2 \times 10^7$ | 40                          | 0                                 | 0       |
| $2 \times 10^7$ | 40                          | 1.0                               | 0       |
| $2 \times 10^7$ | 40                          | 1.5                               | 0       |
| $2 \times 10^7$ | 40                          | 2.0                               | 0       |
| $2 \times 10^7$ | 40                          | 2.5                               | 0       |
| $2 \times 10^7$ | 40                          | 3.0                               | 0       |
| $2 \times 10^7$ | 40                          | 3.5                               | 4       |
| $2 \times 10^7$ | 40                          | 4.0                               | 0       |

キュベット容量:  $400 \mu\text{l}$ , 電極間隔:  $0.2 \text{cm}$ , キャパシタンス:  $25 \mu\text{F}$ ,  
プロトプラスト再生率:  $4.4 \%$

【0029】(2) 表1にある4株の形質転換候補株を  $50 \mu\text{g}/\text{ml}$  のハイグロマイシンBを含むGMY液体培地  $1.5 \text{リットル}$  に接種し、1ヶ月間振盪培養した。得られた菌糸体を凍結乾燥し、実施例1の(1)で述べたのと同様の方法で全DNAを抽出、精製した。この4株の全DNAと野生株の全DNAを鋳型として実施例2の(2)で述べたのと同様の方法でPCRを行ったところ、形質転換候補株の全DNAを鋳型に用いた場合のみ  $hph$  遺伝子とほぼ同じ分子量のDNA断片が増幅された。さらにこのうちの1株の全DNAを用い  $hph$  遺伝子をプローブとしてサザンハイブリダイゼーションを行ったところ、 $hph$  遺伝子を含むDNA断片がシイタケの染色体に挿入されていることが確認された。なお、本発明のプロモーター活性を有するDNA及びターミネーター活性を有するDNAを組み込んだプラスミドを導入

した木材腐朽菌シイタケMIL-S-001は、工業技術院生命工学工業技術研究所にFERM P-16431として寄託されている(寄託日:平成9年9月17日)。

【0030】(3) さらにpLS-PHTの菌根菌に対する有効性を確かめるため、栄養菌糸体の培養の容易なチチアワタケ (*Suillus granulatus*) への導入を行った。チチアワタケの栄養菌糸体の培養、プロトプラストの作出、プラスミドのプロトプラストへの導入方法等はシイタケの場合と全く同様である。また、ハイグロマイシンBのチチアワタケに対する最小生育阻止濃度は  $10 \mu\text{g}/\text{ml}$  であった。プラスミドの導入実験の結果を以下の表2に示す。

【0031】

【表2】

| プロトプラスト数        | プラスミド量<br>( $\mu\text{g}$ ) | 印加電圧<br>( $\text{kV}/\text{cm}$ ) | 出現コロニー数 |
|-----------------|-----------------------------|-----------------------------------|---------|
| $5 \times 10^6$ | 40                          | 1.0                               | 4       |
| $5 \times 10^6$ | 40                          | 1.5                               | 5       |
| $5 \times 10^6$ | 40                          | 2.0                               | 13      |
| $5 \times 10^6$ | 40                          | 2.5                               | 35      |
| $5 \times 10^6$ | 40                          | 3.0                               | 38      |
| $5 \times 10^6$ | 40                          | 3.5                               | 39      |
| $5 \times 10^6$ | 40                          | 4.0                               | 29      |

キュベット容量:  $400 \mu\text{l}$ , 電極間隔:  $0.2 \text{cm}$ , キャパシタンス:  $25 \mu\text{F}$ ,  
プロトプラスト再生率:  $7.6 \%$

【0032】これら出現したコロニーのうち印加電圧が  $2.0 \text{kV}/\text{cm}$ 、 $3.0 \text{kV}/\text{cm}$ 、 $4.0 \text{kV}/\text{cm}$  の試験区からランダムに6株ずつ拾って  $50 \mu\text{g}/\text{ml}$  のハイグロマイシンBを含むGMY寒天培地に植え、生育してきたものをそれぞれ1株ずつ選りシイタケの場合と同様にPCR及びサザンハイブリダイゼーションを行ったところ、 $hph$  遺伝子を含むDNA断片がチチアワタケの染色体に挿入されていることが確認された。以上の結果により、シイタケとチチアワタケで形質転換効率にかなりの差はあるものの、プラスミドpLS-PHTは担子菌の形質転換用ベクターとして木材腐朽菌及び菌根菌の両者に対して有効であることが示された。

【0033】

【発明の効果】本発明のプロモーター活性を有するDN

A及びターミネーター活性を有するDNAを含むベクターによれば、木材腐朽菌と菌根菌のどちらの担子菌をも形質転換することができる。

【0034】

【配列表】

配列番号: 1

配列の長さ: 188

配列の型: 二本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: Genomic DNA

起源

生物名: リオフィラム シメジ (*Lyophyllum shimeji*)

配列の特徴

GPD遺伝子のプロモーター領域

配列

GACAAAGATC TGAGGCCTAG GGGGCTCACA GGAGTGAATG CAGTCCCGTT GTGATATTCG 60  
TGAAAGTTCC AATTTGGATG ATGACGACAT AATCGATCTC CGATGGATTG ATTATCTACT 120



CAGCCATTAT AAAACCCGCC TGGTCGCAGC ACATCCCAA CTCCCCCTC ACACACTTTT 180  
TTATCACC 188

【0035】配列番号：2

配列の長さ：275

配列の型：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

配列

TAGATATCCC GTTCCCTACG ATCTCATCGC TCCCGCCCAT TGACACCCAA GCCCCCTTTT 60  
CATCCACTTT CCACTTTTTC TCACITGCTT AACGGGAGAG GAGATGTGGC TGATGCATGG 120  
GCTGAAAGGA AACAACGGCT GTGATTGGGA CGCGTCTTAT GAGAAGGTAG TACTTTCCGA 180  
CACATACGAC AATCGAAACA AATAGAAATT CTGTTGTACA AGTACTCGGA GTCATCATTC 240  
AAGTACGTTT GTTtaggttg CTGCCGTGCT CTGAC 275

【図面の簡単な説明】

【図1】 ホンシメジのGPD遺伝子とその転写制御領域を含むDNA断片の制限酵素地図を示す図である。

【図2】 プラスミドpLS-DWの制限酵素地図を示す図である。

【図3】 プラスミドpLS-UPの制限酵素地図を示す図である。

起源

生物名：リオフィラム シメジ (*Lyophyllum shimeji*)

配列の特徴

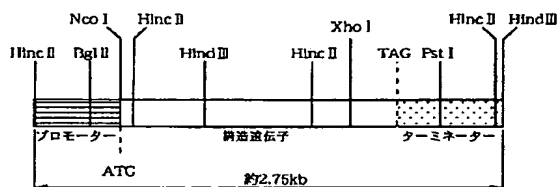
GPD遺伝子のターミネーター領域

【図4】 プラスミドpLS-PROを構築するための手順を示す図である。

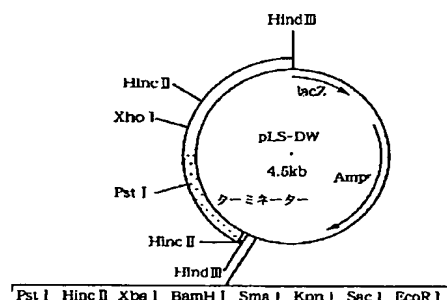
【図5】 中間体ベクターpLS-PHを構築するための手順を示す図である。

【図6】 組換え発現ベクターpLS-PHTを構築するための手順を示す図である。

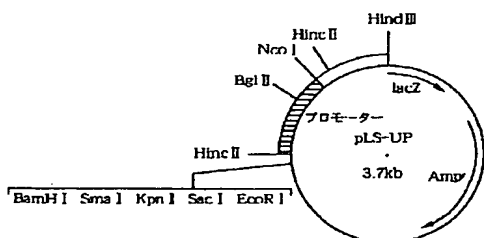
【図1】



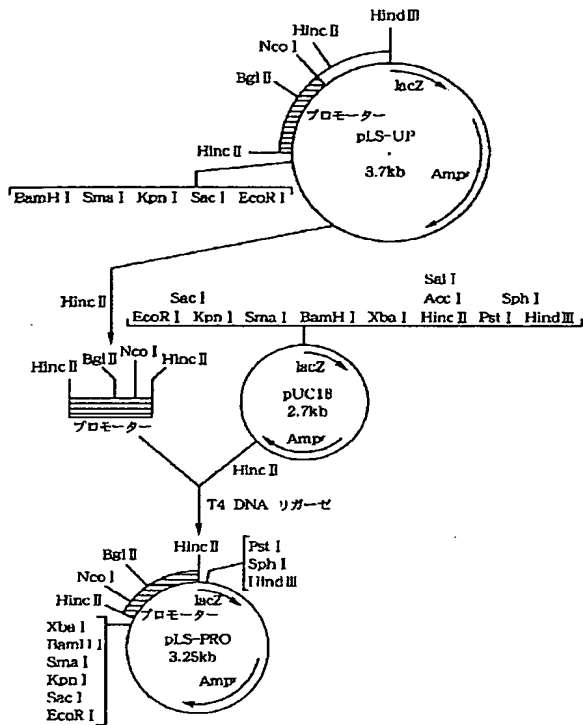
【図2】



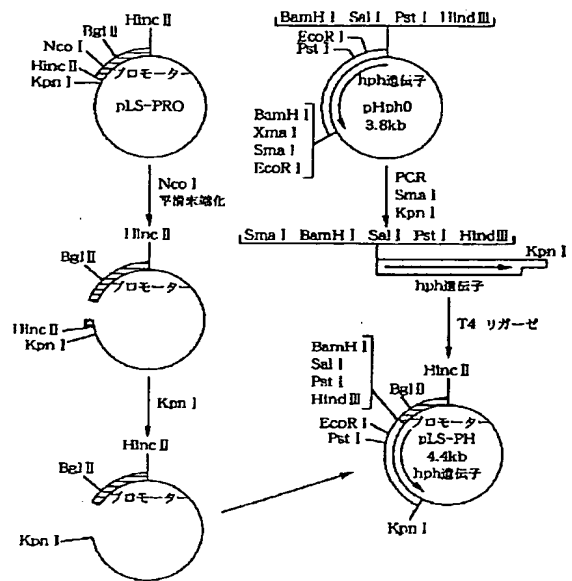
【図3】



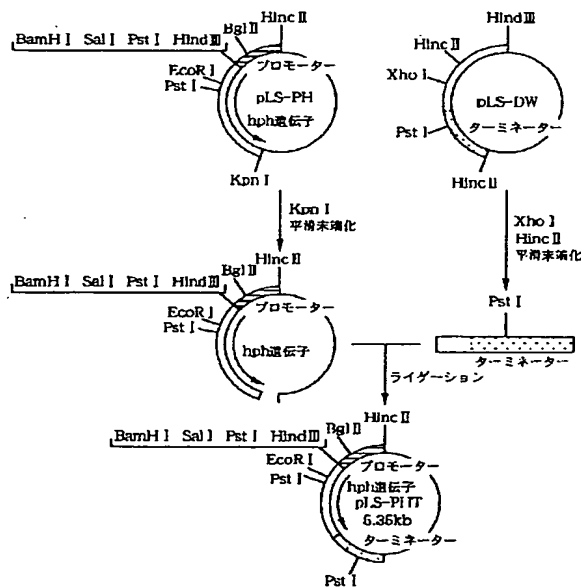
【図 4】



【図 5】



【図 6】



(9)

特開平 1 1 - 1 2 7 8 6 3

フロントページの続き

(51) Int. Cl. 6

識別記号

F 1

C 1 2 R 1:645)